

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE PARIS

par

Madame Léa CLAVILIER

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Etude d'interactions génétiques dans la
régulation pléiotrope de la biosynthèse des
cytochromes (iso-1 cytochrome c, iso-2
cytochrome c, cytochrome b_2) chez la levure.

Soutenue le : 6 Janvier 1971

devant la Commission d'Examen

Mme GANS

Président

MM. SLONIMSKI

GROS

BUTTIN

)

)

)

Examineurs



Mise en évidence de plusieurs loci indépendants impliqués dans la synthèse de l'iso-2-cytochrome c chez la levure

LÉA CLAVILIER, GENEVIÈVE PÉRÉ et PIOTR P. SLONIMSKI

Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S. — 91 — Gif sur Yvette
Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de Paris, France

Reçu Décembre 23, 1968

Several Independent Gene Loci Involved in the Synthesis of Iso-2-Cytochrome c in Yeast

Summary. This study concerns the chromosomal genes controlling the synthesis of cytochrome c in yeast. In the wild type there are two molecular species of cytochrome c : iso-1 (major form) and iso-2 (minor form) which differ in many positions of their amino-acid sequence. A mutation, CY1 $\rightarrow$ cyl-1, in the structural gene for iso-1, leads to iso-1 deficiency, while retaining a normal albeit small amount of iso-2-cytochrome c.

The cyl-1 mutant does not grow on DL-lactate as sole carbon source, while the wild type does. This property was used for selecting cytochrome c rich revertants (CYT) from cytochrome c deficient strains cyl-1; ca 200 revertants were isolated after extensive nitrous acid mutagenesis from a haploid cyl-1 strain or from a diploid cyl-1/cyl-1 strain and ca 30 of them were analyzed genetically and biochemically. The cytochrome c of seven (CYT) revertants was extracted and characterized; none of them contained iso-1-cytochrome c, but all contained large amount of iso-2-cytochrome c sufficient to compensate for the deficiency. It was concluded that none of the revertants resulted from back mutation of cyl-1 and that the cyl-1 mutation is a deletion or some other irreversible aberration. These conclusions were corroborated by genetic analysis. It was shown that every reversion is due to a chromosomal mutation segregating as a single gene. Five unlinked gene loci, CY2A, CY2B, CY2C, CY2D, CY2E, were uncovered in this way. None of them were linked to the CY1 locus. Revertants selected in the diploid strain were dominant or semi-dominant while those selected in the haploid strain were recessive. To the first class belong alleles at loci CY2A, CY2B, CY2C, while to the latter belong alleles at loci CY2D and CY2E.

Five unlinked loci are implicated in iso-2-cytochrome c synthesis. Mutations selected at these loci act as suppressors of cytochrome c deficiency caused by a deletion of the CY1 locus. In fact the mutations do not restore the synthesis of the deficient protein (iso-1-cytochrome c) but increase the synthesis of an another protein, structurally alike (iso-2-cytochrome c), and having very similar if not identical physiological activity. We propose the term of *compensator genes* to define this type of mutations. We discuss some possible mechanisms to explain the rarity of compensator mutations and the hypothesis that the locus CY2A could correspond not only to the regulatory gene for iso-2-cytochrome c but also to the structural one.

Remerciements. Nous tenons à remercier Mlle G. PERRODIN, Mlle M. FOUCHER et Mme I. LAPORTE pour leur assistance technique. Nous remercions également le Docteur D. HAWTHORNE d'avoir bien voulu lire et discuter notre manuscrit.

Ce travail a bénéficié d'un contrat de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire No. 6600168.

Introduction

Chez la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, de nombreuses mutations affectant la chaîne respiratoire sont connues. Les unes concernent les

cytochromes a, a₃ et b: mutations «petites» chromosomique ou cytoplasmique (EPHRUSSI, HOTTINGUER et CHIMENES, 1949); les autres, trouvées plus récemment affectent le cytochrome c. On connaît (SLONIMSKI, ACHER, PÉRÉ, SELS, SOMLO, 1963) un mutant chromosomique pauvre en cytochrome c (cy1-1)¹ parce qu'il ne synthétise qu'une des formes iso-moléculaires du cytochrome c connues chez la souche sauvage. La mutation CY1 vers cy1-1 provoque la perte de l'iso-1-cytochrome c (forme majoritaire) et le mutant ne possède alors que la forme minoritaire (iso-2-cytochrome c). En recherchant des mutations réverses ou de supprimeurs qui permettraient la synthèse de l'iso-1-cytochrome c dans une souche originellement cy1-1, nous avons trouvé des mutations qui augmentent la synthèse de l'iso-2-cytochrome c. Ce sont ces mutations que nous décrivons ici.

Materiel et méthode

a) Souches. Souches d'origine: (CYT LAC) D261	$\frac{a}{\alpha}$	$\frac{CY1}{CY1}$	$\frac{hi1}{+}$	$\frac{+}{tr1}$	$\frac{+}{ad1}$
(cyt lac) D247-2	$\frac{a}{\alpha}$	$\frac{cy1-1}{cy1-1}$			
(cyt lac) D234-5C	α	cy1-1	tr1	ad1	

Les deux premières sont diploïdes et homozygotes au locus CY1; la troisième est haploïde. La première forme beaucoup de cytochrome c (CYT), les deux suivantes en forment très peu (cyt). Elles ont toutes été isolées au laboratoire (SLONIMSKI et al., 1963). (LAC) et (lac) désignent respectivement la capacité ou l'incapacité de croître sur du DL-lactate comme seule source de carbone et d'énergie.

b) Milieux. Milieux de culture.

YPGA:	Yeast extract Difco 1%; Bacto-peptone Difco 1%; dextrosol (ou glucose Prolabo) 2% (P/v); Adénine 20 mg/l.
YPD:	Yeast extract Difco 1%; Bacto-peptone Difco 1%; dextrosol (ou glucose Prolabo) 0,1%; glycérol 2%.
YNB:	Yeast nitrogen base Difco.
YNBG:	— id — additionné de 2% de Glucose
YNBLac:	— id — additionné de 2% de DL-lactate (Analar-BDH)
YNBGLac:	— id — additionné de 0,05% de Glucose et de 2% de DL-lactate.

Ces deux derniers milieux sont amenés à pH 5,0 avec de l'ammoniaque concentrée.

Milieux de *présporulation* et de *sporulation*; ils sont préparés selon McCLARY, NULTY et MILLER, 1959. Tous ces milieux sont, au besoin, solidifiés par addition de 2% de Bacto-agar Difco.

c) *Techniques. Cultures.* — Les cultures sont aérobies, faites à 28°C. Les cultures en milieu liquide sont faites en fioles d'Erlenmeyer contenant un volume de milieu nutritif correspondant au 1/10^e de la contenance totale de la fiole. Ces cultures sont agitées soit à l'aide d'un agitateur magnétique, soit sur une secoueuse. Les cultures en milieu solide sont faites dans des boîtes de Pétri.

Génétique — Les croisements sont faits par mélange de deux souches haploïdes de signe compatible (a et α) en milieu YPGA. Après quelques heures d'incubation, les zygotes sont isolés au micromanipulateur de Fonbrunne et mis à germer sur du milieu YPGA solidifié. Lorsque cela est possible, les diploïdes sont isolés par prototrophie en utilisant comme marqueurs nutritionnels l'auxotrophie pour l'histidine et pour le tryptophane. Les diploïdes

1. Nous indiquerons avec des lettres majuscules (ou par le signe +) l'allèle sauvage et avec des lettres minuscules, les allèles mutés; cette convention sera appliquée sans préjuger des relations de dominance ni de la fonction de l'allèle sauvage ou muté, c'est à dire que l'allèle actif soit l'allèle sauvage ou l'allèle muté. On utilisera deux lettres pour désigner le génotype et trois lettres pour désigner le phénotype.

prélevés sont ensemencés sur du milieu de sporulation, puis les asques sont disséqués après digestion de la membrane par du « Suc d'Hélix Pomatia » (Industries Biologiques Françaises), selon la technique mise au point par JOHNSON et MORTIMER, 1959. Les colonies issues des spores germées sont repiquées une à une sur du milieu YPGA solide et après 24 à 48 h. d'incubation, elles sont testées en fonction de leurs exigences nutritives par la méthode de réplique sur velours sur des milieux synthétiques décrits par GALZY et SLONIMSKI, 1957. La quantité de cytochrome c est déterminée par ailleurs sur des pâtes de levure. Une culture liquide sur du milieu YPGA est utilisée pour ensemencer une boîte de Pétri contenant le même milieu. Après 3 à 5 jours d'incubation à 28°C, les levures sont récoltées sur la surface de la boîte à l'aide d'une spatule et essorées sur du papier filtre. Leur spectre est ensuite observé soit au spectroscopie à faible dispersion de HARTREE à la température de l'azote liquide (SHERMAN et SLONIMSKI, 1964), soit au spectrophotomètre Cary 15 à la température ambiante ou à celle de l'azote liquide (CLAISSE, PÉRÉ, CLAVILIER, SLONIMSKI, en préparation).

d) *Transformation des cellules « grandes » q^+ en « petites » q^- .* Dans les souches ayant peu de cytochrome c, il est parfois difficile de distinguer la part du spectre qui revient au cytochrome c de celle qui revient aux cytochromes b et c_1 . C'est pourquoi nous avons souvent transformé les souches à examiner en « petites » q^- qui ne possèdent ni cytochrome b, ni cytochrome c_1 , ni cytochromes $a + a_3$ (SLONIMSKI, 1953). Bien entendu, cette transformation est faite après avoir récolté les produits de la méiose d'une souche diploïde « grande », puisque les diploïdes « petites » ne sporulent pas. La transformation est obtenue par action de l'acriflavine. Pour cela la souche q^+ est cultivée pendant 48 h. à 28°C dans du milieu liquide YPGA tamponné à pH 6,5 par du tampon phosphate Sørensen contenant 10^{-5} M d'acriflavine. Les cellules sont ensuite étalées sur du milieu solide YPD. Ce milieu est généralement appelé « différentiel » car les cellules q^- qui ne respirent pas ne peuvent utiliser que le glucose par fermentation et ne forment que des petites colonies, alors que les cellules q^+ utilisent à la fois le glucose et le glycérol (uniquement respirable) et de ce fait donnent des grandes colonies. Après incubation, deux ou trois « petites colonies » sont prélevées et cultivées comme au paragraphe précédent pour l'examen de leur spectre cytochromique.

e) *Extraction du cytochrome c.* L'extraction des cytochromes c et leur séparation en formes iso-moléculaires sont faites selon SELS, FUKUHARA, PÉRÉ et SLONIMSKI, 1965. Les souches sont cultivées en milieu naturel (Yeast extract Difco 2%, H_2KPO_4 0,1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,12%, Saccharose 2%), à 28°C en aérobiose (1l. de milieu dans un erlen.de 6l.) jusqu'à la phase stationnaire de croissance. Les cellules sont récoltées par centrifugation; le culot est lavé à l'eau distillée froide puis autolysé par de l'acétate d'éthyle, en milieu réduit. Le cytochrome c isolé est chromatographié sur une colonne d'Amberlite XE 64, l'élution étant faite par un gradient de NaCl de 0,2 M à 0,5 M.

f) *Dosage des protéines.* Il est fait selon la méthode du biuret modifiée par STICKLAND, 1951.

Obtention des mutants

Disposant au départ de souches (cyt), nous voulions obtenir des souches « riches en cytochrome c » (CYT). Pour sélectionner de tels mutants, nous avons utilisé l'observation suivante de M. SOMLO (SLONIMSKI et al., 1963; CLAVILIER, PÉRÉ, SLONIMSKI, SOMLO, 1964): les souches, haploïdes ou diploïdes homozygotes $cy1-1$, qui ne possèdent que l'iso-2-cytochrome c, sont incapables de se multiplier sur du DL-lactate comme seule source de carbone, bien que les enzymes D- et L-lactico-déshydrogénase soient présents dans ces souches; par contre, la souche sauvage croît sur du DL-lactate. On peut penser qu'en sélectionnant des réversions capables de croître sur du DL-lactate à partir d'une souche négative, on pourra obtenir des mutants riches en cytochrome c. Il est probable que parmi les souches (LAC) ainsi sélectionnées, certaines sont devenues positives par un autre mécanisme que celui de l'augmentation de la quantité de cytochrome c. Par exemple, une modification du système d'oxydation du lactate au niveau des déshydrogénases. Cependant, ce système de sélection ayant un très grand pouvoir

de résolution, il sera aisé par une observation spectroscopique directe de distinguer entre des souches riches et des souches pauvres en cytochrome c. Nous ne retiendrons dans ce travail que les souches riches en cytochrome c.

Nous avons utilisé deux souches *cyl-1*: l'une haploïde (D234-5C), l'autre diploïde homozygote pour *cyl-1* (D247-2). Après une culture aérobie en milieu liquide YPGA, les cellules ont été récoltées en phase stationnaire de croissance et lavées stérilement avec de l'eau physiologique. 10^8 à 10^9 cellules/cc ont été incubées à 28°C avec de l'acide nitreux $5 \cdot 10^{-3}$ M, pH 4, pendant 30 à 60 mn. L'action mutagène a été arrêtée par addition de tampon phosphate Sørensen 0,5 M pH 7,3. 10^5 à $2 \cdot 10^6$ cellules survivantes ont été étalées par boîte de Pétri contenant, soit du milieu YNBGLac soit du milieu YNBLac. Une partie aliquote, plus diluée, est étalée sur YPGA afin de déterminer le nombre de cellules survivantes. Celui-ci se situe entre 0,01 et 2%, selon l'expérience.

Les colonies apparaissent sur YNBLac (ou YNBGLac) entre le 8ème et le 30ème jour d'incubation à 28°C. On les prélève au fur et à mesure. On a ainsi recueilli 251 clones, tant à partir de la souche haploïde qu'à partir de la souche diploïde. Chacun a été étalé à nouveau sur milieu YNBLac. Les clones d'origine monoclonale ainsi obtenus sont cultivés sur du milieu glucosé (YPGA) solide afin d'examiner leur spectre cytochromique. On peut voir sur le tableau 1 qu'après

Tableau 1. *Isolement de mutants (CYT) à partir de souches (cyl)*

Souche utilisée	Clones (LAC) recueillis après mutagenèse	Clones (LAC) après repiquages sur DL-Lactate	Clones (LAC, CYT)
Diploïde (D247-2)	9 26	0 14	0 12
<i>cyl-1/cyl-1</i> (cyl, lac)	2 76	2 23	0 3
Total	113	39	15
Haploïde (D234-5C)	34 16	24 8	24 8
<i>cyl-1</i> (cyl, lac)	88	51	40
Total	138	83	72
Totalité des mutants	251	122	87

La première colonne indique la souche (cyl, lac) utilisée pour la mutagenèse; la deuxième colonne, le nombre de clones ayant poussé sur lactate (milieu YNBLac ou YNBGLac); la troisième, le nombre de clones ayant poussé après un second passage sur lactate (YNBLac); la quatrième colonne, le nombre de clones ayant un spectre riche en cytochrome c (CYT). Chaque ligne représente une expérience de mutagenèse indépendante.

repiquage sur YNBLac, 122 colonies seulement ont poussé, parmi lesquelles 87 avaient une quantité de cytochrome c plus élevée que la souche *cyl-1*. Nous avons nommé ces mutants: D247-2-M1, D247-2-M2 etc. ... jusqu'à -M100 s'ils proviennent du diploïde D247-2, et D234-5C-M101, D234-5C-M102 etc. ... s'ils proviennent de l'haploïde D234-5C. Nous écrirons en abrégé: -M1, -M101 etc. ...

Iso-cytochromes c synthétisés par les mutants

A quoi est due l'augmentation de la quantité de cytochrome c dans ces mutants? Y a-t-il eu réapparition de l'iso-1-cytochrome c ou augmentation de la synthèse de l'iso-2-cytochrome c? Pour répondre à cette question, nous avons extrait le cytochrome c de plusieurs mutants indépendants. Ils ont tous été cultivés dans les mêmes conditions aérobies (voir légende du Tableau 2) et les

Tableau 2. Isolement du cytochrome c synthétisé par des souches sauvages et mutantes

Souche	Quantité de protéine autolysée (g)	Teneur en cytochrome c (μ moles/g.protéine)	Type de cytochrome c
D261	3,30	148	(129) (19) iso-1 iso-2
D247-2	2,47	11	iso-2
D247-2-M4	3,18	20	iso-2
-M15	2,54	64	iso-2
-M16	3,52	43	iso-2
-M18	3,26	49	iso-2
-M19	2,85	45	iso-2
-M20	2,81	29	iso-2
-M37	4,05	47	iso-2

La culture est faite en milieu naturel (Yeast extract 1%, H_2KPO_4 0,1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,12%, saccharose 2%) dans des conditions aérobies. Les cellules sont récoltées en phase stationnaire de croissance. On voit que dans la souche cyl-1 (D247-2) la quantité de cytochrome c iso-2 est semblable à celle de l'iso-2 de la souche sauvage (D261). Par contre, les souches -M présentent dans ces conditions 2 à 6 fois plus de cytochrome c iso-2.

quantités de protéines à partir desquelles les extractions ont été faites sont semblables. La figure 1 montre le profil d'élution dans un gradient de NaCl du cytochrome c contenu dans une souche sauvage (D261), dans une souche cyl-1 (D247-2) et dans deux mutants indépendants (-M15 et -M19). Dans le cas de la souche D261 on distingue 2 pics, iso-1 puis iso-2-cytochrome c; dans le cas des souches D247-2, -M15 et -M19 seul iso-2 existe, en quantité accrue pour -M15 et -M19 aussi bien par rapport à D247-2, qu'à D261. Le même profil chromatographique a été observé pour le cytochrome de toutes les souches -M étudiées et on peut voir dans le Tableau 2 les quantités de cytochrome c iso-2 extraites de ces souches. Rappelons que l'iso-2-ferro-cytochrome c diffère de l'iso-1-ferro-cytochrome c par la position du pic α (SLONIMSKI, ACHER, PÉRÉ, SELS, SOMLO, 1963). On retrouve cette caractéristique dans le cytochrome c synthétisé par chacun des mutants -M. On peut donc dire que dans l'échantillonnage étudié, aucun mutant n'a récupéré la possibilité de synthétiser de l'iso-1-cytochrome c; par contre, tous forment une quantité accrue d'iso-2-cytochrome c. Pour les mutants issus de la souche haploïde, seul -M136 a été étudié et le résultat est identique: on observe une augmentation de la synthèse d'iso-2-cytochrome c et pas de restauration de la synthèse d'iso-1. Les mutations intervenues ne sont donc pas des mutations reverses cyl-1 $\rightarrow$ CY1, mais touchent un ou plusieurs autres gènes gouvernant la synthèse de l'iso-2-cytochrome c.

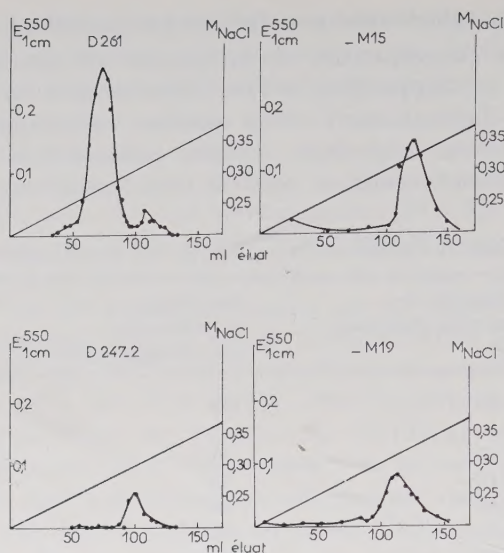


Fig. 1. Profil chromatographique de l'élution du cytochrome *c* extrait de différentes souches. *D261* (CYT): souche de référence CY1/CY1. *D247-2* (cyt): souche *cy1-1/cy1-1*. *D247-2-M15* (CYT) et *D247-2-M19* (CYT): mutants obtenus à partir de la souche précédente. Comme on le voit au Tableau 2, les quantités de protéines dans chaque cas sont voisines, mais non identiques. La figure a été normalisée pour 2,5 g de protéine dans chaque cas. L'ordonnée de gauche indique l'absorption, mesurée à 550 mμ sous 1 cm d'épaisseur, de chaque fraction réduite par l'hydrosulfite de Na. L'ordonnée de droite indique la molarité du gradient NaCl

Etude génétique des mutants (CYT) obtenus à partir de la souche diploïde (cyt)

Comme il a été signalé les révertants (LAC, CYT) sont rares, même après une mutagenèse très importante dont témoigne la faible proportion des survivants. Il est donc probable que les revertants que nous avons pu isoler, contiennent des lésions variées. Avant d'entreprendre une étude génétique et physiologique des mutations (cyt) → (CYT) il nous a paru nécessaire d'effectuer un ou deux backcross successifs par une souche *cy1-1*, afin de diminuer les effets de ces lésions. De fait on constate que la sporulation et la germination des spores des révertants d'origine sont en général mauvaises. Elles s'améliorent beaucoup après ces backcross.

Huit mutants (CYT) ont pu être étudiés génétiquement. Ce sont: *D247-2-M4*, *-M15*, *-M16*, *-M18*, *-M19*, *-M32*, *-M33*, *-M37*. Les autres souches n'ont généralement pas sporulé ou, lorsque des spores ont pu être isolées, elles n'ont pas germé. Nous avons d'abord isolé chacune des mutations à l'état haploïde en faisant sporuler le diploïde mutant, puis en isolant les ascospores par microdissection. Ensuite, une spore de phénotype (CYT, LAC) a été croisée par une souche *cy1-1*. Ce diploïde a été disséqué et nous avons à nouveau isolé des spores de phénotype (CYT, LAC). Lorsque la germination des spores était encore mauvaise, un deuxième croisement par *cy1-1* et une nouvelle dissection ont été réalisés. C'est à partir des haploïdes ainsi obtenus que nous avons effectué les tests de recombinaison, d'une part avec le gène *CY1*, d'autre part des mutants entre eux.

A. Caractère monogénique des mutations (*cyt*) → (*CYT*)

Nous donnerons en détail le protocole suivi pour l'étude de la souche D247-2-M15. Cet exemple a été choisi comme un cas extrême des difficultés que nous avons pu rencontrer. Le révertant d'origine -M15 a été mis en milieu de pré-sporulation pendant 24 h., puis en milieu de sporulation aéré par agitation pendant 3 jours, à 28°C. La sporulation était abondante (environ 90%), et après digestion de la membrane de l'asque par de l'enzyme d'escargot, 38 tétrades ont été disséquées et mises à germer sur du milieu solide YPGA. La croissance a été très lente: 6 jours alors qu'une souche sauvage germe en 2 à 3 jours. Aucune tétrade complète n'a germé; la plupart des tétrades n'ont eu qu'une (14 tétrades) ou 2 (21 tétrades) spores germées. Au total 49 spores ont été examinées pour leur capacité de pousser sur DL-lactate et pour leur spectre cytochromique. 46 spores avaient le phénotype (*cyt*, *lac*), 3 seulement avaient le phénotype (*CYT*, *LAC*). L'une de ces spores D247-2-M15-7A (que l'on écrira -M15-7A) a été croisée avec une souche *cy1-1*:

$$\begin{array}{ccc} -M15-7A & \times & DPI-1A = LM333 \\ (CYT, LAC) & & (cyt, lac) \\ & & \alpha cy1-1 hi1 tr1 \end{array}$$

La sporulation du diploïde LM333 a été bonne et la germination des spores s'est améliorée: sur 24 asques isolés, 6 ont totalement germés, 8 ont donné 3 spores sur 4. 40 spores ont été analysées provenant de 4 asques à 4 spores et de 8 à 3 spores. Pour les 4 tétrades on trouve une ségrégation 2:2, aussi bien pour les marqueurs nutritionnels introduits: histidine et tryptophane, que pour le caractère (*CYT*):(*cyt*). Sur l'ensemble des 40 spores on a les résultats suivants:

$$\begin{array}{ccc} (HIS):(his) & (TRY):(try) & (CYT):(cyt) \\ 15 \quad 25 & 20 \quad 20 & 14 \quad 26 \end{array}$$

ce qui ne diffère pas significativement d'une ségrégation 2:2. Dans cette descendance nous avons repris une spore (*CYT*) que nous avons croisée à nouveau avec une souche *cy1-1*:

$$333-8D \times D234-2C = LM343$$

$$\begin{array}{ccc} (CYT) & & (cyt) \\ a tr1 hi1 & & \alpha cy1-1 \end{array}$$

La germination des spores issues de ce nouveau diploïde a été bonne: 83% des spores ont poussé, dont 9 asques complets sur 18 disséqués et 6 asques à 3 spores germées. 8 tétrades complètes ont été étudiées: les marqueurs (*his*) et (*try*) de même que le signe de croisement et la quantité de cytochrome c, ségrègent toujours monogéniquement. C'est à partir des clones issus de ces spores que nous avons effectué les tests d'allélisme, décrits plus loin.

Pour les autres mutants apparus à partir de la souche diploïde D247-2, le même protocole d'expérience a été suivi. Le nombre de croisements effectués et le résultat de l'analyse de tétrades sont indiqués dans les Tableaux 3 et 4. Dans tous les cas, nous avons trouvé qu'après les backcross les mutations -M ségrègent de façon monogénique. On voit, sur la fig. 2, l'exemple d'une ségrégation 2:2 dans la tétrade issue du croisement d'une souche portant la mutation -M18 et d'une souche *cy1-1*.

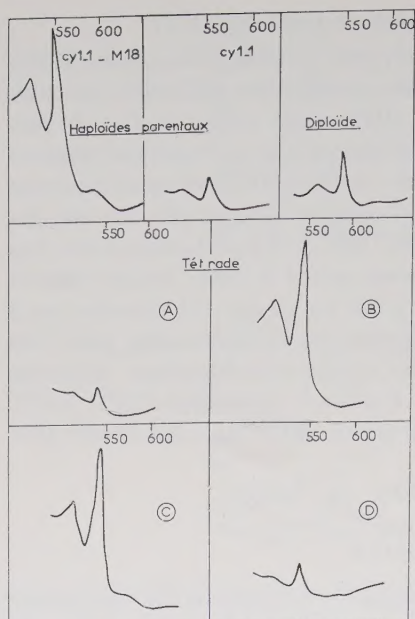


Fig. 2. *Spectre cytochromique des cellules intactes: exemple d'une ségrégation monogénique.* Les souches impliquées dans le backcross de la mutation -M18 par *cy1-1* ont été transformées en «petites» g^- . On peut observer que le diploïde a une concentration en cytochrome c intermédiaire entre les 2 haploïdes parentaux. La tétrade issue de ce diploïde montre 2 spores (CYT): B et C, et 2 spores (cyt): A et D. Au dessus de chaque graphique sont indiquées les longueurs d'onde en $m\mu$.

Tableau 3. *Ségrégation du phénotype (CYT):(cyt) dans les souches mutantes et dans la souche *cy1-1/cy1-1* dont elles sont issues*

Souches	Tétrades disséquées	Tétrades complètement germées	Spores analysées	Spores de phénotype (CYT):(cyt)
D247-2	13	8	32 (8 tétrades)	0:32
D247-2-M4	10	4	12 (3 tétrades)	6: 6
-M15	38	0	49	3:46
-M16	26	0	3 (dans la même tétrade)	3: 0
-M18	28	1	41 (dont 1 tétrade)	41: 0
-M19	69	0	65	65: 0
-M32	50	0	29	15:14
-M33	24	2	27 (dont 2 tétrades)	27: 0
-M37	73	1	39 (dont 1 tétrade)	39: 0

La germination des spores est mauvaise; néanmoins on peut isoler dans tous les cas des spores (CYT). On peut distinguer 2 catégories de mutants: ceux qui ne donnent que des spores (CYT) et ceux qui donnent à la fois des spores (CYT) et des spores (cyt).

Tableau 4. *Backcross des spores mutantes (CYT) par une souche cyl-1*

Mutation	Nom du diploïde issu du croisement par cyl-1	Tétrades dis-séquées	Tétrades complètes-ment germées	Tétrades analysées	Spores de phénotype:		
					(HIS):(his)	(TRY):(try)	(CYT):(cyt)
-M4	LM 315 ^a	26	11	9	18:18	18:18	18:18
-M15	LM 333 ^a	24	6	4	8:8	8:8	8:8
	LM 343 ^b	21	9	8	16:16	16:16	16:16
-M16	LM 313 ^a	13	5	5	10:10	10:10	10:10
	LM 345 ^b	26	26	10	20:20	20:20	20:20
-M18	DP 9 ^a	11	7	7	14:14	14:14	14:14
-M19	LM 374 ^a	28	10	10	20:20	20:20	20:20
-M32	LM 325 ^a	26	4	4	3:13 ^c	3:13 ^c	8:8
	LM 347 ^b	93	8	8	16:16	16:16	16:16
-M33	DP 19 ^a	26	21	13	26:26	26:26	26:26
-M37	LM 575 ^a	23	10	19	18:18	18:18	18:18

On peut voir que la germination des spores s'est améliorée par rapport aux résultats du tableau 3. A l'exception de LM325, on obtient toujours une ségrégation monogénique pour chacun des marqueurs, aussi bien des marqueurs nutritionnels que des phénotypes (CYT):(cyt).

^a Ces croisements ont été faits à partir d'une spore (CYT) issue du mutant d'origine et d'une souche cyl-1.

^b Ce 2ème diploïde a été constitué à partir d'une spore (CYT) du diploïde précédent et d'une souche cyl-1.

^c Nous observons ici des ségrégations digéniques, des expériences annexes indiquent que la croissance des spores (HIS), (TRY) est inhibée par la DL—méthionine présente dans le milieu de test.

Nous pouvons observer que, dans le cas des mutants d'origine -M16, -M18, -M19, -M33, -M37, nous n'avons obtenu que des spores ayant beaucoup de cytochrome c, même lorsque nous avons recueilli des tétrades complètes (par exemple pour -M18, -M33 ou -M37).

B. Tests d'allélisme

1. *avec le locus CY1.* Le fait que dans les mutants dont le cytochrome c a été isolé, on ne retrouve jamais d'iso-1-cytochrome c, nous montre déjà que nous ne sommes pas en présence de réversions de l'allèle cyl-1 vers CY1. Nous allons vérifier génétiquement qu'il en est ainsi. Tous les mutants (CYT) issus de D247-2, ont été croisés avec une souche (CYT) de génotype CY1. L'analyse des tétrades descendant des diploïdes ainsi formés est résumée dans le Tableau 5. Nous voyons tout d'abord que nous obtenons à partir du croisement de deux souches haploïdes (CYT) des spores haploïdes (cyt), c'est à dire des spores recombinées. Il s'agit donc bien de gènes différents de CY1. La classification des tétrades en DP, DR et TT, quant au phénotype (CYT):(cyt) ne présente pas de difficulté. L'examen se fait au microspectroscope ou au spectrophotomètre Cary 15

Tableau 5. Absence de liaison entre les mutations (CYT) et le locus CY1

Mutations	Nom du diploïde issu du croisement par CY1	Nombre de tétrades				% de recombinaison
		TT	DR	DP	Total	
-M4	LM 306	26	6	8	40	47
-M15	LM 541	8	1	6	15	33
-M16	LM 542	11	4	4	19	50
-M18	DP 10	6	1	1	8	50
-M19	LM 543	15	0	5	20	37
-M32	LM 361	6	1	2	9	44
-M33	LM 371	23	6	6	35	50
-M37	LM 649	9	0	2	11	41
-M136	DP 43	3	2	4	9	39
-M137	DP 50	5	3	2	10	55

Les pourcentages de recombinaison se situent entre 33 et 55% ce qui, étant donné la petite taille de l'échantillon, ne diffère pas statistiquement de 50%. Ces pourcentages sont calculés à partir des tétrades ditypes parentaux (DP), ditypes recombinés (DR), tétratypé (TT). Tous les croisements sont faits entre une spore (CYT) issue du backcross décrit au tableau 4 et une souche (CYT) de génotype CY1.

Les différentes tétrades sont composées ainsi (voir également figures 3 et 4):

DP = 4 (CYT): 0 (cyt)

DR = 2 (CYT): 2 (cyt)

TT = 3 (CYT): 1 (cyt)

(voir techniques). Les ségrégations entre le gène CY1 et les mutations -M de phénotype (CYT) se présentent exactement de la même manière que celles des figures 3 et 4.

2. des mutants (CYT) entre eux. La dernière étape de ce travail génétique a été l'étude de la recombinaison des différents mutants (CYT) entre eux. Nous avons croisé, deux à deux, les souches portant les mutations: -M4; -M15; -M16; -M18; -M19; -M32; -M37. Toutes ces souches étaient de génotype *cy1-1*. Dans chaque croisement les parents étaient de phénotype (CYT) et l'apparition de spores (cyt) témoigne d'une recombinaison génétique. Les tétrades sont classées comme précédemment en DP, DR et TT et des exemples de tétrade TT et DR sont donnés par les figures 3 et 4. Le Tableau 6 indique les croisements effectués et le nombre de spores recombinées (cyt) sur le nombre total de spores étudiées.

On voit que les 8 mutations -M appartiennent à 3 loci indépendants que nous nommerons désormais: CY2A, CY2B, CY2C. Le locus CY2A comprend 5 allèles CY2A-16, -18, -19, -33, -37; CY2B ne comporte qu'un seul allèle: CY2B-32; CY2C en comporte deux: CY2C-4, -15. Les mutations sont assignées à deux loci différents lorsque la proportion des spores recombinées (cyt) est élevée. Par contre, les mutations sont assignées au même locus lorsque le pourcentage des spores recombinées est nul ou très faible. En fait, aucun des loci n'est lié car le pourcentage de spores recombinées (cyt) dans les croisements inter-loci n'est statistiquement pas différent de 25% (Tableau 6). Rappelons que par l'étude spectrophotométrique nous ne pouvons distinguer qu'une seule classe de spores recombinées: celle qui a le phénotype (cyt). Dans un croisement de 2 gènes non liés cette classe doit représenter le quart du nombre total de spores. D'autre

Tableau 6. *Test d'Allélisme des mutants entre eux*

Nom du locus	Mutation	-M16	-M18	-M19	-M33	-M37	-M32	-M4	-M15	-M136	-M137
CY 2 A	-M16	$\frac{0}{40}$	$\frac{0}{32}$	$\frac{0}{60}$	$\frac{0}{32}$	$\frac{0}{40}$	$\frac{4}{35}$	$\frac{13}{50}$	$\frac{23}{84}$	$\frac{22}{80}$	
	-M18		$\frac{0}{60}$				$\frac{6}{20}$		$\frac{7}{25}$	$\frac{8}{40}$	$\frac{5}{17}$
	-M19								$\frac{11}{27}$	$\frac{8}{40}$	
	-M33		$\frac{0}{318}$		$\frac{0}{40}$		$\frac{4}{29}$		$\frac{8}{25}$		
	-M37					$\frac{0}{14}$	$\frac{5}{25}$		$\frac{8}{34}$		
CY 2 B	-M32		$\frac{19}{109} = 17,4\%$				$\frac{0}{32}$		$\frac{10}{30}$	$\frac{7}{35}$	
CY 2 C	-M4						$\frac{0}{40}$	$\frac{0}{52}$			
	-M15		$\frac{60}{245} = 24,5\%$				$\frac{10}{30} = 33\%$	$\frac{0}{110}$	$\frac{0}{18}$	$\frac{9}{33}$	
CY 2 D	-M136		$\frac{38}{245} = 23,8\%$				$\frac{7}{35} = 20\%$	$\frac{9}{33} = 27\%$	$\frac{0}{60}$	$\frac{10}{54}$	
CY 2 E	-M137		$\frac{5}{17} = 29,4\%$						$\frac{10}{54} = 19\%$		
			CY 2 A				CY 2 B	CY 2 C	CY 2 D	CY 2 E	

Dans la partie droite du tableau est indiqué, pour chaque croisement, le nombre de spores recombinées (cyt) sur le nombre total de spores étudiées. Dans la partie gauche est indiquée la somme des spores (cyt) sur la totalité des spores pour l'ensemble d'un locus. En regard est inscrit le % de ces spores (cyt), à gauche et dans le bas est inscrit le nom attribué à chaque locus.

part, dans les croisements intra-locus, nous n'avons jamais trouvé de spore recombinée (cyt). Cette étude a été poussée le plus loin pour le locus CY2A où aucune spore (cyt) n'a été trouvée sur 318 spores étudiées. Il est donc clair que les mutations 2A-16, -18, -19, -33, -37 sont pour le moins fortement liées. La question de savoir si elle constituent des homo- ou des hétéro-allèles ne peut pas, pour l'instant, être tranchée. Une telle étude exigerait une résolution génétique plus fine. Il est indispensable de préciser la nomenclature des gènes concernant la synthèse des iso-cytochromes c, afin d'éviter toute confusion. A la même époque et indépendamment de nous, SHERMAN, TABER et CAMPELL, 1965,

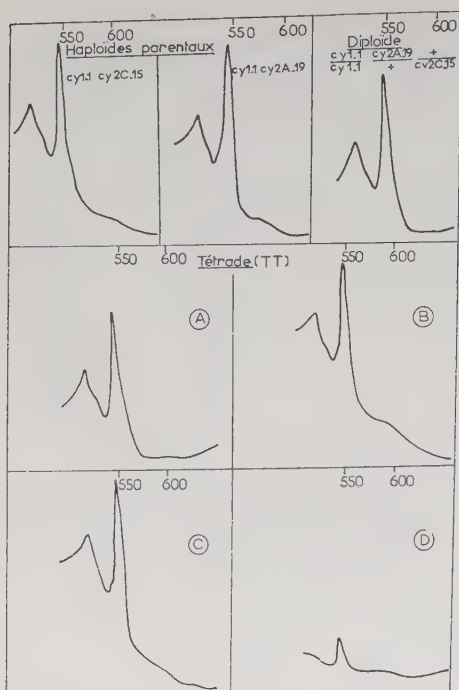


Fig. 3

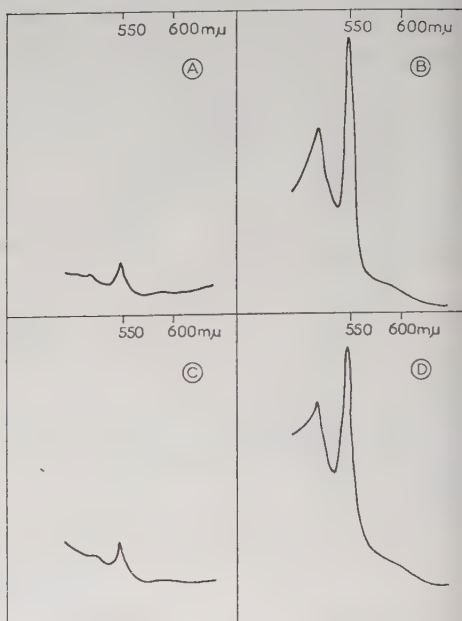


Fig. 4

Fig. 3. Spectre cytochromique des cellules intactes: exemple de tétrade TT d'une ségrégation digénique. Les souches impliquées dans le test d'allélisme entre les mutations -M15 et -M19 ont été transformées en « petites » c^- . Le diploïde a le même phénotype (CYT) que les haploïdes parentaux (CYT). La tétrade issue de ce diploïde montre 3 spores (CYT): A, B et C, et une spore (cyt): D. C'est un tétratype. Au-dessus de chaque graphique sont indiquées les longueurs d'onde en $m\mu$.

Fig. 4. Spectre cytochromique des cellules intactes: exemple de tétrade DR d'une ségrégation digénique. Il s'agit du même croisement que dans la figure 3, mais ici on a une tétrade ditype recombinée présentant 2 spores (CYT) et 2 spores (cyt)

ont isolé à partir de la souche sauvage (CYT) des mutants ayant peu de cytochrome *c* comme ceux que nous désignons par le phénotype (cyt). SHERMAN et coll. n'ont pas analysé leurs mutants afin de savoir si la déficience porte sur l'iso-1, l'iso-2-cytochrome *c* ou les deux à la fois. Ils ont appelés ces mutants *cy2*, *cy3*, etc. . . sur la base de leur indépendance génétique. Nous préférons adopter la nomenclature où le chiffre (1 ou 2) indique l'iso-cytochrome *c* sur lequel la mutation a porté et une lettre (A, B, C etc. . .) pour désigner le gène, chaque lettre majuscule désignant un gène indépendant. Dans notre nomenclature le chiffre et la lettre sont suivis par un tiret; le chiffre après le tiret indique l'allèle muté. Il serait intéressant d'étudier les relations d'allélisme entre les loci mis en évidence par SHERMAN et coll. et ceux du présent travail, bien que la recherche des mutants soit basée sur des principes inverses: (cyt) → (CYT) dans notre cas, (CYT) → (cyt) dans le cas de SHERMAN et coll.

Constitution de diploïdes à différentes doses d'allèles mutés

Afin d'entreprendre l'étude physiologique et biochimique des souches contenant ces divers gènes (CLAVILIER, FUKUHARA, PÉRÉ, PRADINES, SOMLO, SLONIMSKI, 1966; FUKUHARA, CLAVILIER, PÉRÉ, SLONIMSKI, sous presse; PÉRÉ, CLAVILIER, SLONIMSKI, en préparation), nous avons construit pour chaque allèle de chaque locus les diploïdes homozygotes et hétérozygotes à la fois pour les loci CY1 et CY2A, 2B ou 2C. Par exemple, en ce qui concerne les loci CY1 et CY2A, nous avons construit les diploïdes suivants, les autres loci CY2B, CY2C étaient dans ce cas homozygotes pour leurs allèles sauvages.

$\frac{\text{cy 1-1}}{\text{cy 1-1}}$	$\frac{\text{cy 2A-18}}{+}$	(DP9)	$\frac{\text{cy 1-1}}{\text{cy 1-1}}$	$\frac{\text{cy 2A-18}}{\text{cy 2A-18}}$	(DP30)
$\frac{\text{cy 1-1}}{+}$	$\frac{\text{cy 2A-18}}{+}$	(DP10)	$\frac{\text{cy 1-1}}{+}$	$\frac{\text{cy 2A-18}}{\text{cy 2A-18}}$	(DP33)
$\frac{+}{+}$	$\frac{\text{cy 2A-18}}{+}$	(DP34)	$\frac{+}{+}$	$\frac{\text{cy 2A-18}}{\text{cy 2A-18}}$	(DP31)

Les haploïdes utilisés pour ces constructions sont issus d'une part de la descendance de D247-2-M18, puis de celle de DP9 pour les souches *cy1-1 cy2A-18*. Le génotype dans ce cas est directement déductible de la ségrégation du phénotype 2(CYT):2(cyt). D'autre part, les haploïdes CY1 *cy2A-18* sont choisis dans les tétrades DR issues de l'hybride DP10 qui résulte du croisement (CYT) $\times$ (CYT). Dans la descendance de cet hybride on obtient des tétrades DR, 2(CYT):2(cyt). Le phénotype (CYT) ne peut correspondre qu'au génotype CY1 *cy2A-18*. On vérifie ce génotype par croisement avec une souche *cy1-1 CY2A* lequel conduit à une ségrégation digénique pour le phénotype (CYT):(cyt).

Nous avons également construit des diploïdes contenant diverses combinaisons de gènes appartenant à trois loci: CY1, CY2A, CY2B par exemple.

Étude génétique des mutants (CYT) obtenus à partir de la souche haploïde (cyt)

L'étude des mutants haploïdes a été menée selon un protocole partiellement différent de celui qui a été suivi pour les mutants diploïdes.

A. Croisement par une souche *cy1-1*

Tous les mutants haploïdes (CYT, LAC) issus de la souche D234-5C ont été croisés par la même souche *cy1-1*: LM306-12B. Tous les diploïdes obtenus ont le phénotype (cyt). La plupart d'entre eux sont simultanément (lac), mais quelques-uns se révèlent capables de croissance, faible mais certaine, sur cette source de carbone.

Ceci indique que les mutations ne sont pas des mutations réverses *cy1-1* $\rightarrow$ CY1 et qu'elles sont récessives (Fig. 5).

Il faut signaler que l'on observe une certaine fluctuation dans le phénotype (CYT) des mutants haploïdes. Des souches comme -M136 ou -M138, tout en ayant plus de cytochrome c qu'une souche *cy1-1*, en ont moins qu'une souche sauvage. Cette fluctuation est plus marquée lorsque les souches étudiées sont des «grandes» respiratoires ρ^+ . Ceci résulte du fait que l'appréciation au microspectroscope de la concentration en cytochrome c est plus difficile lorsque

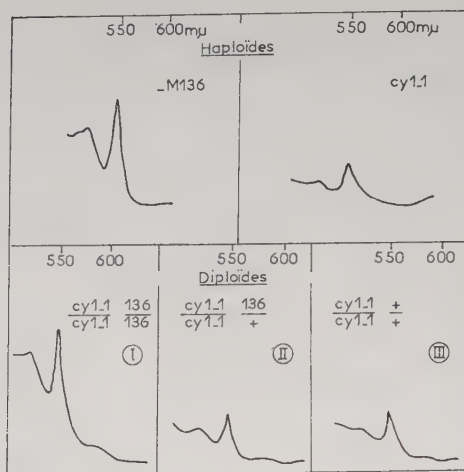


Fig. 5. Spectre cytochromique des cellules intactes: récessivité de la mutation *-M136*. L'haploïde contenant la mutation *-M136* a le phénotype (CYT), l'haploïde contenant *cy1-1* a le phénotype (cyt). Les trois diploïdes diffèrent par la dose de mutation 136. Lorsque la souche est homozygote pour *-M136*, (I), elle a le phénotype (CYT), lorsqu'elle est hétérozygote, (II), elle a le même phénotype (cyt) que l'homozygote pour l'allèle sauvage de la mutation 136, (III). Les souches impliquées ont été transformées en «petites» g^-

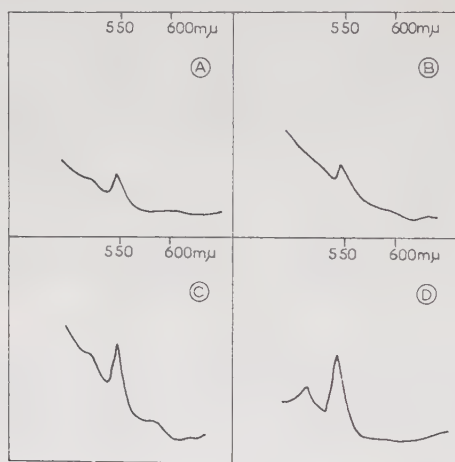


Fig. 6. Spectre cytochromique des cellules intactes: exemple d'une ségrégation monogénique. On voit ici un exemple de tétrade issue du diploïde hétérozygote (II) de la figure 5. Deux spores sont (cyt) comme l'un des parents, les deux autres sont (CYT) comme le parent portant la mutation *-M136*. Les souches impliquées ont été transformées en «petites» g^-

la cellule produit également des quantités importantes de cytochromes b et c1. Il peut être remédié à cela par détermination spectrophotométrique de la concentration en cytochrome c. Finalement la démonstration la plus nette est obtenue par l'étude spectrophotométrique de toutes les souches impliquées dans un croisement après leur transformation en «petites» g^- qui ne possèdent ni cyto-

Tableau 7. *Backcross des mutants (CYT) par une souche cy1-1*

Nom du diploïde issu du croisement par cy1-1	Tétrades disséquées	Tétrades complètement germées	Spores analysées	Spores de phénotype		
				(HIS):(his)	(TRY):(try)	(CYT):(cyt)
1131	12	9	20 (5 tétrades)	10:10	10:10	10:10
1136	11	8	32 (8 tétrades)	16:16	16:16	17:15
1137	12	6	24 (6 tétrades)	12:12	12:12	11:13
1138	16	5	20 (5 tétrades)	10:10	13: 7	11: 9
1142	11	5	20 (5 tétrades)	10:10	10:10	10:10
1148	12	0	9	5: 4	6: 3	6: 3
1157	12	2	20 (dont 2 tétrades)	11: 9	10:10	11: 9
1176	13	1	25 (dont 1 tétrade)	10:15	15:10	15:10
1181-2	13	9	20 (5 tétrades)	10:10	11: 9	10:10
1188	13	0	18	7:11	11: 7	11: 7
1210	47	17	36 (dont 6 tétrades)	18:18	16:20	17:19
1212	9	2	14 (dont 2 tétrades)	7: 7	7: 7	8: 6
1229	12	1	16 (dont 1 tétrade)	10: 6	8: 8	8: 8

*analyse de tétrade est compatible avec la ségrégation d'un seul gène gouvernant le caractère (CYT):

chrome b, ni cytochrome c1. Comme on le voit sur la figure 5, il n'y a plus aucune ambiguïté dans la détermination du phénotype.

Rappelons que les quelques difficultés que nous avons rencontrées pour l'étude du phénotype (CYT):(cyt) dans la descendance des mutants obtenus à partir de la souche haploïde, ne se sont jamais présentées dans l'étude des mutants issus de la souche diploïde. Ces derniers produisent des quantités de cytochrome c suffisamment élevées pour que l'étude au microspectroscope des souches, même à l'état ρ^+ , ne présente pas de difficultés.

Sur 72 mutants (LAC) isolés (Tableau 1) nous en avons retenu 19 de phénotype (CYT) pour l'étude génétique ultérieure. La première question que l'on s'est posée est de savoir si les mutations considérées sont mono- ou plurigéniques. Pour cela les diploïdes issus du croisement de -M131, -M136 etc. . . par la souche cy1-1, LM306-12B, ont été mis à sporuler. Six de ces diploïdes n'ont pas sporulé,

et le Tableau 7 résume l'analyse des tétrades obtenues à partir de 13 diploïdes. Presque toutes les sporulations ont été mauvaises, souvent inférieures à 10%. Le germination des spores a été médiocre à quelques exceptions près: 1131, 1136 et 1181 par exemple. Néanmoins, les ségrégations observées sont compatibles avec une monogénicité du caractère (CYT):(cyt). Un exemple en est donné dans la figure 6. Le mutant -M137 mérite une attention spéciale, car il s'est révélé être thermosensible: cultivé sur milieu YPGA pendant 2 ou 3 jours à 28°C, il présente à peine plus de cytochrome c qu'une souche cyl-1, alors que cultivé dans le même milieu pendant le même temps à 37°C, il a beaucoup de cytochrome c.

B. Test d'allélisme

1. *par complémentation fonctionnelle chez les diploïdes.* Nous disposions donc d'une vingtaine de mutants de phénotype (CYT). Il convenait de savoir si ces mutants appartiennent au même locus ou à des loci différents.

Habituellement le test de complémentation fonctionnelle est effectué entre deux mutants déficients pour la production d'une protéine. On dit qu'ils appartiennent au même groupe de complémentation lorsque la souche diploïde est toujours déficiente et qu'ils appartiennent à deux groupes de complémentation différents lorsque le diploïde n'est plus déficient. Il n'est pas courant d'utiliser ce test pour des mutants qui produisent un excès d'une protéine comme c'est notre cas. Cependant rien ne s'y oppose sur le plan formel. Si deux mutants produisant un excès d'iso-2-cytochrome c à la suite de mutations récessives conduisent à la formation d'un diploïde également riche en iso-2-cytochrome c, on dira qu'ils appartiennent au même groupe de complémentation, au contraire, si le diploïde est déficient en iso-2-cytochrome c on dira que les deux mutants appartiennent à deux groupes de complémentation différents.

Pour faire le test de complémentation fonctionnelle dans notre cas, il était indispensable d'utiliser des souches telles que le diploïde soit homozygote pour le gène cyl-1. Ceci permet de supprimer totalement la production d'iso-1-cytochrome c, la complémentation ne concerne alors que la production d'iso-2-cytochrome c. Pour cela nous avons utilisé les mutants d'origine et trois souches testrices, toutes cyl-1 et de phénotype (CYT). Les diploïdes ont été sélectionnés par prototrophie pour les marqueurs (his) et (try). Le phénotype cytochromique des diploïdes a été déterminé. Le Tableau 8 résume les résultats.

Les souches à tester sont arrangées dans l'ordre d'une complémentation de plus en plus faible avec la mutation -M136. La matrice de complémentation présente certains résultats facilement interprétables, d'autres non. A titre d'exemple, on obtient des résultats cohérents avec les mutations -M136, -M129, -M210 qui se complémentent partiellement ou totalement dans toutes les combinaisons étudiées. Elles appartiennent sans ambiguïté au même group de complémentation. De même la mutation -M134 donne un résultat cohérent, puisqu'elle ne se complémente ni avec -M136, ni avec -M210. Par contre, l'interprétation des complémentations impliquant les souches -M183, -M188, -M138 par exemple est plus difficile. Il nous semble prématuré de tenter d'optimiser cette matrice en vue de l'établissement d'une carte de complémentation linéaire. Les résultats du Tableau 8 ont été obtenus par une étude spectroscopique des souches ρ^+

Tableau 8. *Phénotypes cytochromiques des diploïdes*

Souche à tester	Souche testrice			Souche à tester	Souche testrice		
	1136-7C	1210-2C	1138-2C		1136-7C	1210-2C	1138-2C
M129	(+)	(+)	(+)	M212	(+)		
136	(+)	(+)	(±)	225	(+)		
131	(+)		(±)	142	(±)	(±)	(±)
144	(+)		(±)	141	(±)	(±)	(-)
166	(+)	(±)	(-)	181	(±)		(+)
210	(+)	(±)	(-)	138	(±)	(-)	(+)
148	(+)		(-)	169	(±)		(-)
157	(+)		(-)	176	(±)		(-)
175	(+)		(-)	215	(±)		
191	(+)		(-)	134	(-)	(-)	
183	(+)	(-)	(-)	137	(-)	(-)	(-)
188	(+)	(-)	(-)				

Les souches «à tester» sont toutes les mutants d'origine, -M129, -M131 etc. de phénotype (CYT) et de génotype α cyl-1 tr1; les souches «testrices» sont des spores (CYT), α cyl-1 hi1, choisies dans la descendance du diploïde résultant du croisement d'un mutant d'origine (CYT) par la souche haploïde LM306-12B, α cyl-1 hi1. Rappelons que toutes les souches de ce tableau portent la mutation cyl-1 et que le phénotype (CYT) se révèle récessif lorsqu'on les croise avec une souche cyl-1 (cf. fig. 5).

Le signe (+) indique que le phénotype du diploïde résultant du croisement entre la souche à tester et la souche testrice, toutes les deux (CYT), est également (CYT); les deux mutations appartiennent donc au même groupe de complémentation. Le signe (±) est employé quand le phénotype du diploïde correspond à un phénotype intermédiaire entre les phénotypes (CYT) et (cyt): on considère alors comme probable, et non certaine, l'appartenance des deux mutations au même groupe de complémentation. Le signe (-) indique que le phénotype du diploïde est (cyt): les deux mutations appartiennent à deux groupes de complémentation bien distincts. Les cases vides signifient que le test n'a pas été effectué.

qui ne peut donner qu'une estimation grossière du phénotype cytochromique. Il est alors concevable que certaines incohérences ne sont qu'apparentes et dues à l'imprécision de l'observation. Une étude spectrophotométrique des souches α cyl-1, nécessairement plus laborieuse, analogue à celle de la figure 5, permettrait de trancher.

2. *par étude de la recombinaison.* Six des diploïdes dont il est question au paragraphe précédent, résultant du croisement entre une souche cyl-1 porteuse de la mutation -M136 avec six mutants différents, ont été disséqués.

Les résultats (Tableau 9) indiquent que les mutations -M136, -M131, -M138, -M157 et -M181, sont au même locus, ou du moins très étroitement liées; par contre, les mutations -M136 et -M137 sont à des loci différents; ceci vient en confirmation des conclusions tirées du test de complémentation.

Le cas du mutant -M142 prête à perplexité: il se complémente partiellement avec -M136, mais on note dans la descendance du croisement -M136 $\times$ -M142 quelques spores (cyt), ce qui indiquerait que -M136 et -M142 pourraient appartenir à des loci distincts. On peut également invoquer ici les variations du phénotype (CYT), signalées plus haut.

Tableau 9. *Test d'allelisme d'une souche portant la mutation 136 (CYT) avec six autres mutants (CYT)*

	D234-5C -M131	-M138	-M157	-M181	-M137	-M142
1136-7C	$\frac{0}{36}$	$\frac{0}{24}$	$\frac{0}{21}$	$\frac{0}{34}$	$\frac{10}{54}$	$\frac{3}{19}$

Pour chaque croisement on indique le nombre de spores recombinées (cyt) sur le nombre total de spores étudiées. Quatre mutations (-M131, -M138, -M157, -M181) semblent être au même locus que la mutation -M136, tandis que deux mutations (-M137 et -M142) ne le sont pas.

En résumé donc, la vingtaine de mutants (CYT) obtenus à partir de la souche haploïde *cyl-1* se répartit à coup sûr en deux loci:

- celui de -M136, qui les groupe en majorité,
- celui de -M137, qui est thermosensible.

C. *Étude des liaisons avec le locus CY1*

Comme dans le cas des mutants obtenus à partir de la souche diploïde, nous avons voulu savoir, par un test de recombinaison, si les mutations survenues aux deux loci -M136 et -M137 n'étaient pas allèles du gène CY1. Nous avons donc croisé une souche *cyl-1* M136 et une souche *cyl-1* M137 par une souche CY1; les résultats de l'analyse de la descendance de ces croisements sont portés dans le Tableau 5, et montrent que ni le gène 136, ni le gène 137 ne sont allèles du gène CY1; ils montrent aussi que ces deux gènes ne sont pas liés au gène CY1.

D. *Étude de la liaison avec les loci des mutants diploïdes*

Il était évidemment intéressant de savoir si l'un des deux loci -M136 ou -M137 coïncidait avec l'un des trois loci CY2A, CY2B et CY2C découverts précédemment et donc d'étudier la descendance des croisements impliquant -M136 ou -M137, et un représentant des loci 2A, 2B, 3C. Les résultats des croisements réalisés sont portés dans le Tableau 6. Il apparaît que le locus -M136 est distinct des trois loci 2A, 2B, 2C. Nous le désignerons dorénavant par CY2D. Il apparaît également que le locus -M137, déjà distinct du locus CY2D, l'est aussi du locus CY2A, mais on ignore s'il est lié ou non aux loci CY2B et CY2C.

Discussion

Le but originel de ce travail était de chercher des réversions synthétisant beaucoup de cytochrome c en partant de souches qui en sont en grande partie dépourvues, puisqu'incapables de synthétiser l'iso-1-cytochrome c. Ceci a pu être entrepris à la suite de la découverte d'une méthode de sélection hautement résolutive (SLONIMSKI et al., 1963; CLAVILIER et al., 1964) basée sur le fait que les souches ayant peu de cytochrome c (*cyl*) ne poussent pas sur le lactate comme seule source de carbone. Dans ce travail nous avons analysé génétiquement de nombreuses réversions ainsi obtenues. La même méthode de sélection sur le lactate a été reprise plus tard par SHERMAN, STEWART, MARGOLASH, PARKER, CAMPBELL (1966) en utilisant, comme souches de départ, d'autres allèles du locus CY1 déficients en iso-1-cytochrome c.

Gènes Compensateurs

Toutes les réversions lactate positives synthétisant beaucoup de cytochrome c que nous avons obtenues sont dues à la mutation de gènes autres que CY1. Ceci est démontré tant par les études génétiques que par les études biochimiques, qui concordent parfaitement. D'une part, les gènes mis en évidence sont non alléliques et non liés au locus CY1, d'autre part le cytochrome c dont ils gouvernent la synthèse est non pas l'iso-1-cytochrome c, mais l'iso-2-cytochrome c. Cette situation nous apparaît intéressante, puisqu'il s'agit là d'un nouveau mécanisme de régulation du métabolisme cellulaire. En effet, la déficience due à la mutation du gène de structure de l'iso-1-cytochrome c est compensée par une seconde mutation qui conduit à une synthèse accrue d'une protéine qui, tout en ayant une séquence d'acides aminés différente présente une activité enzymatique très semblable, sinon identique, c'est à dire l'iso-2-cytochrome c. Sur le plan de la génétique formelle, les mutations aux loci CY2A, CY2B, CY2C, CY2D agissent comme des supprimeurs de la déficience en cytochrome c consécutive à la mutation au locus CY1.

Pour distinguer leur mécanisme d'action de celui, bien connu actuellement, des supprimeurs de mutations nonsense (voir GAREN, 1968), il nous paraît utile de désigner les mutations au loci CY2A-2D par un autre terme que celui de supprimeurs. Le terme de *gène compensateur* nous paraît le plus approprié. Il est évident que les phénomènes de compensation de fonctions complexes à la suite de mutations caractérisent tout métabolisme cellulaire. Ce dont il s'agit ici est différent dans ce sens que la compensation se situe au niveau d'une fonction enzymatique bien spécifique due à l'activité d'une protéine unique.

Les caractéristiques d'un gène compensateur seraient les suivantes. Il gouverne (en tant que gène de structure ou en tant que gène de régulation) la synthèse d'une protéine A'. La structure primaire de cette protéine est différente par plusieurs substitutions disséminées tout au long de la chaîne de celle d'une autre protéine A, dont la synthèse est gouvernée à coup sûr par un gène de structure distinct et peut être même par un système de régulation distinct. Néanmoins, sur le plan de certaines activités métaboliques, les protéines A et A' sont mutuellement interchangeables. Il s'ensuit que toute mutation qui augmente la synthèse de la protéine A' peut compenser une mutation qui inactive, diminue ou abolit la protéine A. Les mutations décrites ici aux loci CY2A-2D agissent de cette manière. Théoriquement il devrait exister une situation symétrique dans laquelle les mutations de la protéine A compenseraient une déficience de la protéine A'. Dans notre cas ces mutations n'ont pas pu être recherchées, puisque nous ne disposons pas actuellement de mutation conduisant à une déficience de la protéine A', c'est à dire en l'occurrence de l'iso-2-cytochrome c.

Il est plausible que de tels gènes compensateurs soient apparus, dans un génome haploïde, au cours de l'évolution d'une espèce, par duplication d'un gène de structure unique à l'origine. Ces deux gènes identiques au départ ont pu diverger dans leur séquence par l'accumulation de mutations différentes. Si cette différenciation a été poussée très loin, elle donne naissance à des protéines à fonctions distinctes. C'est le mécanisme bien connu imaginé pour expliquer l'apparition de nouvelles fonctions catalytiques (voir *Evolving Genes and Proteins*, 1965). Si cette diversification est plus restreinte, le second gène peut garder

un effet compensateur, en cas de besoin. Il est vraisemblable qu'au cours de l'évolution deux tendances principales et antagonistes se manifestent. L'une tend à la diversification et à l'acquisition de nouvelles fonctions, l'autre tend au maintien de deux gènes mutuellement compensateurs. Il nous paraît utile de souligner que ces deux processus évolutifs peuvent exister simultanément dès que le nombre de copies du gène primitif est supérieur à deux (par plusieurs duplications, par exemple). Dans ce cas deux gènes peuvent être maintenus comme gènes compensateurs, tandis que les autres divergeraient vers l'acquisition de nouvelles fonctions. Notons que nous avons mis en évidence plusieurs loci non liés (CY2A-2D) agissant comme gènes compensateurs. Ceci pourrait être en relation avec cette idée. Cependant, si on observe l'existence de tels gènes, comme dans notre cas, deux interprétations sont permises:

a) le processus de diversification fonctionnel n'est pas suffisamment avancé pour les protéines A et A' dans l'évolution de l'espèce.

b) la pression de sélection a favorisé le maintien du tandem de gènes compensateurs. Il n'est pas possible actuellement de choisir entre les deux. Notons que l'hypothèse de gènes compensateurs ne préjuge en rien le rôle régulateur suggéré pour l'iso-2-cytochrome c (SLONIMSKI et al., 1963).

Mécanisme d'apparition des mutations

Les mutations aux locis CY2A-2D appartiennent au moins à deux catégories quant à la fréquence de leur apparition. La première catégorie englobe les mutations qui ont été localisées par la suite aux loci CY2A-2C; elles apparaissent avec une fréquence très faible. Nous n'avons pas fait d'étude systématique de la fréquence d'apparition de ces mutations; celles que nous avons obtenues l'ont été après une mutagenèse très poussée (survie de l'ordre de 0,01%), ce qui, chez une souche diploïde, correspond certainement à un nombre de lésions très élevé. Malgré cette forte mutagenèse, les mutants (LAC, CYT) ont été relativement rares (de l'ordre de 10^{-6} mutant par survivant). La deuxième catégorie englobe les mutations localisées aux loci CY2D-2E; ces mutations, par contre, sont apparues avec une fréquence nettement plus élevée, bien que la mutagenèse ait été moins poussée (survie entre 1 et 2%) ce qui, chez une souche haploïde, doit correspondre à un nombre de modifications plus faible. On pourrait penser que cette différence dans la fréquence d'apparition des mutations est exclusivement due au fait que la souche utilisée dans le premier cas est diploïde *cyl-1/cyl-1*, alors que dans le second cas la souche est haploïde *cyl-1*. Seules les mutations dominantes peuvent être décelées chez le diploïde, alors que toutes les mutations, récessives ou dominantes, sont immédiatement décelées chez l'haploïde. Signalons dès maintenant qu'effectivement toutes les mutations obtenues chez la souche haploïde se sont révélées récessives (voir fig. 5), tandis que les mutations obtenues chez la souche diploïde se sont révélées dominantes ou semi-dominantes. Le problème de la dominance des mutations CY2A-2D sera étudié en détail dans le cadre général des recherches sur la régulation de l'expression des gènes gouvernant la synthèse des iso-cytochromes c (CLAVILIER et al., 1966; PÉRÉ, CLAVILIER, SLONIMSKI, en préparation). Cependant, la rareté des mutations (*cyt*)→(*CYT*) chez la souche diploïde ne nous semble pas être entièrement expliquée par la

Facilité de détection des mutations dominantes ou récessives en fonction de la ploïdie de la souche de départ. Il se pourrait que, chez le diploïde, des phénomènes de recombinaisons ou de remaniements chromosomiques doivent nécessairement s'ajouter pour qu'un mutant (CYT) puisse être sélectionné. Notons qu'il est vraisemblable que la mutagenèse poussée à l'aide de l'acide nitreux favorise des remaniements mitotiques (NASIM et AUERBACH, 1967). Il est intéressant de noter à cet égard que toutes les mutations qui ont été ultérieurement situées au locus CY2A étaient apparemment à l'état homozygote ou hémizygote dans la souche diploïde mutante d'origine. En effet, après la méiose de ces mutants d'origine, nous n'avons récolté que des spores (CYT) (voir Tableau 3, mutants -M16, -M18, -M19, -M33 et -M37). Deux classes d'hypothèses peuvent être envisagées pour rendre compte de ce fait.

1. Le diploïde muté est effectivement homozygote pour la mutation *cy2A-x*, soit à la suite de deux événements mutationnels indépendants, soit, ce qui serait plus probable, à la suite d'un événement mutationnel unique, suivi d'une recombinaison mitotique conduisant à l'homozygotie. Les cellules homozygotes pour la mutation se multiplieraient plus vite sur le lactate que les cellules hétérozygotes; de ce fait, les colonies sélectionnées seraient plutôt du premier type. Cet argument, bien que plausible, ne rend pas compte du fait que seules les mutations au locus CY2A n'ont donné que des spores (CYT), tandis que les mutations aux loci CY2B et CY2C ont permis de récupérer à la fois des spores (CYT) et des spores (*cyt*) après la méiose des mutants d'origine (voir Tableau 3).

2. Le diploïde qui a muté porterait, sur le chromosome homologue de celui qui porte la mutation *cy2A-x*, une mutation létale à l'état haploïde. Seules les spores qui ont le chromosome portant la mutation *cy2A-x* pourraient croître. La germination des spores issues des mutants d'origine est effectivement très faible, en accord avec cette hypothèse et, d'une manière générale, avec la mutagenèse très poussée dont nous avons discuté plus haut. Dans le cas d'un létal à l'état hétérozygote, on n'aurait pas dû trouver de tétrades dont toutes les spores germent. Nous en avons trouvé quatre. Cet argument n'est pas décisif contre l'hypothèse puisque la proportion de tétrades complètes est très faible (4 sur 220 disséquées — voir Tableau 3). Ceci est compatible avec une recombinaison qui aurait introduit le chromosome porteur de la mutation *cy2A-x* (donc non-porteur du létal) dans les quatre produits de la méiose. Effectivement, les spores, dans ce cas, sont toutes (CYT) (Tableau 3). Si on adopte l'hypothèse, il faut envisager quel est le mécanisme qui permet d'obtenir à la fois la mutation *cy2A-x* sur un chromosome et un létal en face sur le chromosome homologue et ceci, soulignons-le, dans les cinq cas indépendants de mutation du locus CY2A. Le mécanisme le plus plausible nous paraît être la translocation d'un fragment d'un chromosome homologue sur l'autre, ce qui conduit, d'une part, à une déficience à effet létal, d'autre part, à une duplication dont les effets sont difficiles à prévoir a priori, mais qui se manifesterait, dans notre cas, par une synthèse accrue de l'iso-2-cytochrome c, c'est à dire une mutation *cy2A-x*. Notons que, même si les mutations *cy2A-x* ont pour origine un remaniement chromosomique, celui-ci n'a pas de répercussions importantes dans les méioses ultérieures. Après deux backcross successifs, la méiose semble se dérouler normalement chez les souches porteuses des mutations *cy2A-x* à l'état hétérozygote ou homozygote.

cy1-1 est une délétion

Bien que les mutations (cyt) $\rightarrow$ (CYT) apparaissent avec une fréquence faible, nous en avons cependant obtenu quatre-vingt-sept et étudié une trentaine (soit par test de recombinaison, soit par test de complémentation). Toutes ces mutations ont été localisées à des loci différents de CY1; aucune ne provoque la restauration de la synthèse de l'iso-1-cytochrome c; elles ne sont donc pas des mutations réverses. Ces résultats, brièvement exposés en 1964 (CLAVILIER, PÉRÉ, SLONIMSKI, SOMLO) montrent que la mutation *cy1-1* est une délétion. Signalons qu'en 1965, SHERMAN, TABER et CAMPBELL mentionnent des résultats préliminaires sur l'absence de réversions chez la souche *cy1-1* qui confirment ce point de vue.

Gènes de structure, gènes de régulation

Parmi les dix mutants qui ont été étudiés par le test de recombinaison (Tableau 6) nous avons mis en évidence cinq loci CY2A-CY2E non liés, la fréquence de mutation à l'intérieur de chaque locus étant variable: on a trouvé cinq allèles pour CY2A, alors qu'on n'en a trouvé qu'un seul pour CY2B. Il est clair que nos résultats actuels sont loin d'être exhaustifs. Une analyse ultérieure des mutants non encore étudiés révélera probablement l'existence d'autres allèles à ces loci, et peut-être même celle d'autre loci. Il est néanmoins intéressant de discuter dès à présent le fait que des mutations à plusieurs loci ont toutes pour effet d'augmenter la concentration de l'iso-2-cytochrome c. Les gènes CY1, CY2A, CY2B, CY2C, CY2D ne sont pas liés entre eux; ils ne peuvent donc pas faire partie d'un opéron, tel qu'il a été décrit par JACOB, PERRIN, SANCHEZ, MONOD (1960). Une étude physiologique détaillée nous renseignera sur le mode d'action de chacun de ces gènes, ainsi que sur les relations de dominance et d'épistasie qui peuvent exister entre eux. Le seul point que l'on puisse dès maintenant envisager est de chercher à savoir lesquels, parmi ces gènes, pourraient spécifier la structure des iso-cytochromes c.

On sait déjà que le gène CY1 est le gène de structure de l'iso-1-cytochrome c (SLONIMSKI et al., 1963; SHERMAN, STEWART, MARGOLIASH, PARKER, CAMPBELL, 1966). Les gènes CY2A-CY2D sont certainement des gènes de régulation de l'iso-2-cytochrome c, puisqu'ils contrôlent le taux de synthèse de cette protéine. En effet, les mutations CY2A-CY2D ont été sélectionnées en prenant pour critère l'augmentation de la concentration de l'iso-2-cytochrome c. D'autre part, l'étude détaillée du fonctionnement de ces gènes a clairement montré que certains avaient une fonction régulatrice, non seulement dans la synthèse de l'iso-2-cytochrome c mais également dans celle de l'iso-1-cytochrome c et celle du cytochrome b₂ (CLAVILIER et al., 1966; PÉRÉ, CLAVILIER, SLONIMSKI, en préparation). Ceci n'exclut pas que l'un de ces gènes puisse être le gène de structure de l'iso-2-cytochrome c; la mutation de ce gène entraînerait, comme conséquence du changement de structure, un changement dans la régulation de la synthèse de la protéine. Le gène qui correspondrait le mieux à cette hypothèse serait CY2A. Selon l'hypothèse énoncée, la translocation aboutirait à une duplication du gène de structure de l'iso-2-cytochrome c (voir fig. 7). Deux possibilités s'offrent alors: a) la duplication conduit à un accroissement de la quantité d'iso-2-cytochrome c synthétisé, soit simplement à cause de la double

dose du gène de structure $i2^+$, soit à cause de modification de l'environnement chromosomique en position *cis*. b) le changement dans la séquence des nucléotides, nécessairement impliqué par cette duplication, conduit en plus à une modification de la séquence des acides aminés au niveau de l'iso-2-cytochrome synthétisé dans ces conditions. Les deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives.

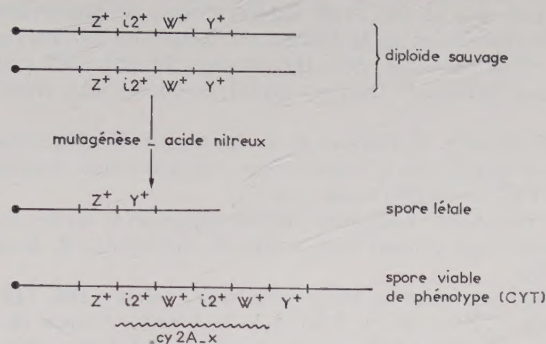


Fig. 7. Schéma hypothétique d'une translocation conduisant à l'apparition des mutations $cy2A-x$. $i2^+$ = gène de structure de l'iso-2-cytochrome c. Z^+ , W^+ , Y^+ : régions voisines hypothétiques. On postule que l'absence de la région W^+ est létale. La spore viable a le phénotype (CYT) par suite de la mutation $cy2A-x$ qui conduit: a) à une synthèse accrue de l'iso-2-cytochrome c; b) à une modification de structure de cet iso-2? L'autre spore est létale à cause de la déficience de la région $i2^+$ W^+

On trouvera dans FUKUHARA et al. (sous presse) des expériences qui donnent à penser que les souches porteuses d'une mutation au locus CY2A synthétisent effectivement un iso-2-cytochrome c dont la structure n'est pas identique à celle de l'iso-2-cytochrome c synthétisé par la souche sauvage. Il est donc possible que le locus CY2A corresponde au gène de structure de l'iso-2-cytochrome c. Mais il faut, cela va de soi, attendre pour en être certain que les séquences des iso-2-cytochromes c mutés aient été établies. Ce travail est en cours de réalisation au laboratoire.

Ajoutons enfin, que tout le déterminisme génétique de la synthèse des cytochromes c semble être exclusivement chromosomique. On le savait déjà pour l'iso-1-cytochrome c (SLONIMSKI et al., 1965; SHERMAN et al., 1966), on le voit ici pour l'iso-2-cytochrome c. La mutation cytoplasmique q^- ne modifie en rien les interactions dues aux gènes CY2A-2D. L'augmentation de la quantité de cytochrome c observée chez les «petites» ne synthétisant que de l'iso-2-cytochrome c est la même celle décrite pour les souches «grandes» (SLONIMSKI, 1953).

Mutations (LAC, *cyt*)

Comme on le voit sur le Tableau I, un certain nombre de mutants (LAC) [122—87 = 35] n'étaient pas (CYT). Ces mutants ne synthétisent donc pas une quantité accrue de cytochrome c. Pour expliquer leur croissance sur lactate, on peut évoquer plusieurs mécanismes, tels que la modification du système d'oxydation du lactate au niveau des deshydrogenases spécifiques, ou au niveau d'autres enzymes impliqués dans ce métabolisme. L'étude de ces mutants n'a pas été envisagée ici.

Bibliographie

- CLAISSE, M., G. PÉRÉ, L. CLAVILIER et P. P. SLONIMSKI: En préparation.
- CLAVILIER, L., H. FUKUHARA, G. PÉRÉ, M. PRADINES, M. SOMLO et P. P. SLONIMSKI: Régulation du système cytochromique chez la levure. *Bull. Soc. franc. Physiol. vég.* **12**, 7—15 (1966).
- G. PÉRÉ, P. P. SLONIMSKI et M. SOMLO: Contrôle génétique de la biosynthèse des iso-cytochromes c. Abstracts of the Sixth Intern. Congr. of Biochemistry, p. 673 (1964).
- EPHRUSSI, B., H. HOTTINGER et A. M. CHIMENES: Action de l'acriflavine sur les levures. I: La mutation «Petite colonie». *Ann. Inst. Pasteur* **76**, 351—367 (1949).
- Evolving genes and proteins (V. BRYSON and H. S. VOGEL, ed.). New York: Acad. Press 1965.
- FUKUHARA, H., L. CLAVILIER, G. PÉRÉ et P. P. SLONIMSKI: Modifications des protéines de l'iso-1 et de l'iso-2-cytochrome c, consécutives aux mutations chromosomiques aux loci CY2A, CY2B, CY2C et CY2D. (Sous presse.)
- GALZY, P., et P. P. SLONIMSKI: Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **245**, 2423—2426 (1957).
- GAREN, A.: Sense and non sense in the genetic code. *Science* **160**, 149—159 (1968).
- JACOB, F., D. PERRIN, C. SANCHEZ et J. MONOD: L'OPÉRON, Groupe de gène à expression coordonnée par un opérateur. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **250**, 1727—1729 (1960).
- JOHNTSON, J. R., and R. K. MORTIMER: Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bact.* **78**, 292 (1959).
- MACCLARY, D. O., N. L. NULTY, and G. R. MILLER: Effect of K. versus Na in the sporulation of *Saccharomyces*. *J. Bact.* **78**, 362—368 (1959).
- NASIM, A., and C. AUERBACH: The origin of complete and mosaic mutants from mutagenic treatment of single cells. *Mut. Res.* **4**, 1—14 (1967).
- PÉRÉ, G., L. CLAVILIER et P. P. SLONIMSKI: En préparation.
- SELS, A., H. FUKUHARA, G. PÉRÉ et P. P. SLONIMSKI: Cinétique de la biosynthèse induite de l'iso-1-cytochrome c et de l'iso-2-cytochrome c au cours de l'adaptation à l'oxygène. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **95**, 486—502 (1965).
- SHERMAN, F., and P. P. SLONIMSKI: Respiration deficient mutants of yeast. II: Biochemistry. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **90**, 1—15 (1964).
- J. W. STEWART, E. MARGOLIASH, J. PARKER, and W. CAMPBELL: The structural gene of yeast cytochrome c. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **55**, 1498—1504 (1966).
- H. TABER, and W. CAMPBELL: Genetic determination of iso-cytochrome c in yeast. *J. molec. Biol.* **13**, 25—39 (1965).
- SLONIMSKI, P. P.: La formation des enzymes respiratoires chez la levure. Paris: Masson & Cie. 1953.
- R. ACHER, G. PÉRÉ, A. SELS et M. SOMLO: Eléments du système respiratoire et leur régulation: cytochromes et iso-cytochromes. *Symp. Intern. sur les Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes*, p. 435—461. C.N.R.S. Paris: 1965.
- STICKLAND, L. H.: The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reactions. *J. gen. Microbiol.* **5**, 698—703 (1951).

Communicated by F. KAUDEWITZ and W. MAAS

Madame L. CLAVILIER
Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S.
91 — Gif sur Yvette — France

